

001. US 5,491,227

6

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-298803

(43) 公開日 平成6年(1994)10月25日

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>

C 0 8 B 37/00

識別記号

庁内整理番号

Z 7433-4C

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 発明の数 7 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平6-34576

(22) 出願日 平成6年(1994)3月4日

(31) 優先権主張番号 9 3 0 4 4 4 6

(32) 優先日 1993年3月4日

(33) 優先権主張国 イギリス (GB)

(71) 出願人 591256000

ジェンザイム・リミテッド

GENZYME LIMITED

イギリス、イングランド、シービー9・8

ビーユー、サフォーク、ヘイバーヒル、ホ

ランズ・ロード37番

(72) 発明者 ロバート・ダンカン・カッソン

イギリス、イングランド、エムイー13・8

イーティー、ケント、フェイバーシャー

ム、パーク・ロード33番

(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリマーの分子量を減少する方法

(57) 【要約】

【目的】 ポリマーの分子量を減少する方法。

【構成】 ポリマーを適当な圧力下、適当なパッセージで圧力ホモジナイゼーションに付すことを特徴とする、制御された、ポリマーの分子量減少法であり、多糖類、特にヒアルロン酸に適する。

【効果】 分子量減少の結果を予測することができ、再現性があり、制御が可能であり、様々なポリマーの分子量を容易に減少することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 制御された、ポリマーの分子量を減少する方法であって、該ポリマーを圧力ホモジナイゼーションに付すことを特徴とする方法。

【請求項2】 ポリマーが多糖である請求項1記載の方法。

【請求項3】 該多糖がヒアルロン酸である請求項2記載の方法。

【請求項4】  $1.2 \times 10^6$  Dから $1.5 \times 10^6$  Dの分子量を得るために、ヒアルロン酸／セチルトリメチルアンモニウムブロミド溶液を10-25 MPaの圧力下、単一パッセージで、圧力ホモジナイゼーションに付すことを特徴とする請求項1-3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】  $1.2 \times 10^6$  Dから $1.5 \times 10^6$  Dの分子量を得るために、精製ヒアルロン酸溶液またはヒアルロン酸細胞不含ブrossを5-20 MPaの圧力下、単一パッセージで、圧力ホモジナイゼーションに付すことを特徴とする請求項1-3のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 ヒアルロン酸の分子量を約100,000 D以下にするために、供給材料を、高压下、好ましくは、少なくとも100 MPaにおいて、複数回パッセージ、好ましくは、少なくとも20パッセージで、圧力ホモジナイゼーションに付すことを特徴とする請求項1-3のいずれかに記載の方法。

【請求項7】 100-275 MPaの圧力下、20-30パッセージで圧力ホモジナイゼーションを行うことを特徴とする請求項6記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ポリマーの分子量を減少するための制御された方法に関し、さらに詳しくは、本発明は、特に多糖類の分子量を減少する上で有用な圧力ホモジナイゼーション法に関する。

【0002】

【従来技術および発明が解決すべき課題】 驚くべきことに、圧力ホモジナイゼーション法を用いて、ポリマー、特にヒアルロン酸(HA)、カルボキシメチルセルロース(CMC)、およびグアーゴム(guar gum)(GG)などの多糖類の分子量の、制御された再現性ある減少法が得られることが分かった。これらの多糖類の性質が多岐にわたることは、本発明方法が、ポリヒドロキシブチレート(PHB)のような他のポリマーにも広範に適用可能であることを示唆している。ただし、本発明の第1の興味はHAにあるので、本明細書では、本発明方法を特にHAに関して記載する。HAはD-グルクロン酸単位とN-アセチルグルコサミン二糖単位の繰返しを含む長鎖多糖である。それは種非特異性であり、例えば、動物組織、例えば、雄鶏のとさかや豚の緒から抽出する【クライン(Klein J.)およびメイヤー(Meyer F.A.) 1983, Biochem. & Biophys. Res. Comm. 755: 400-41

1] か、細菌種、例えばストレプトコッカス(*Streptococcus*)からHA殻物質を得る【ファンブラント(Van Brunt, J.), 1986, Biotechnology 4: 780-782]方法のいずれかによって得ることができる。そのような供給源から得たHAは様々な分子量種の混合物として存在し、全体の分子量は平均分子量で表わされる。

【0003】 HAは眼科手術および術後癒着防止などの様々な治療適用が可能であるのみならず、他の分野でも多くの可能性を有している。HAの使用における重点は、低濃度で高粘性溶液を与えるその流体力学特性にある(Van Brunt, 前掲)。HA溶液の粘度は、HAの濃度と、一義的にはその分子量に依存している。粘性特性は材料を希釈することによって変化させ得るが、多くの適用例でこれは受け入れられない。これまでに提案された様々な分子量のHA製造戦略には、所望の分子量域のHAを生産し得る細菌変異体を選択すること、あるいは特定の分子量域のHAの生産を増大するために細菌の培養期間中の生理学的条件を変化することなどが含まれる。しかしながら、これらの方法のどれによっても特定の適用に必要な範囲および多様性の分子量種を得ることができなかった。別法として、高分子量HAの低分子量部分への減少は、酵素的、化学的または物理的手段によっても達成できる。酵素法によるHAの減少は既知である【ハマイら(Hamai A. et al.), 1989, Agric. Biol. Chem., 58(8): 2163-2168]が、コントロールがかなり困難であり、HAの分子量分布が大きくなる傾向があり、高度に規定された分子量範囲を必要とする幾つかの適用のための物質の製造にはむかないことになる。化学的方法【ハリスら(Harris, M.J. et al.), 1972, JACS, 94: 7570-7572]も同じ問題を抱えており、さらに、結果として治療用生成物中に残渣濃度の反応化学物質が残存するかもしれない。HAを規定の分子量種に分離することは容易である【アーマンド(Armand, G.)およびレイス(Reyes, M.), 1983, Biochem. & Biophys. Res. Comm., 112(1): 168-175]が、操作が複雑で大量生産における制御が困難である。

【0004】 物理的手段に関しては、長い間、長鎖多糖類は、剪断に敏感であると一般に信じられていた。最近、加工での要求において、たまたま処理容量の点から、細胞を発酵ブrossから得るために高シェアーディスクスタック遠心機(high shear disc stack centrifuge)を用いる必要が生じ、驚いたことには、HAの全分子量が殆どまたは全く減少されていないことが分かった。これは、多糖が従来考えられていたほど、剪断に敏感でないことを示すものであった。現在の様々な分子量のHAの必要性に鑑みて、幾つかの可能性が考えられた。これまでは、高い剪断力の故に、圧力ホモジナイゼーション(均質化)が想定されたことはなかったが、HAが以前に考えられていたよりも剪断に敏感でないというこの驚異的な観察の結果、そのような多糖類、並びに

他のポリマーのための、制御された分子量減少法として研究されるに至った。

【0005】即ち、本発明は、制御された、ポリマーの分子量を減少する方法であって、該ポリマーを圧力ホモジナイゼーションに付すことを特徴とする方法を提供するものである。本発明方法は、特にヒアルロン酸(HA)のような多糖類に適する。圧力ホモジナイゼーションは、広範囲の用途を有し、通常、約275MPa(40,000psig)まで、より一般的には約105MPa(15,000psig)までの圧力で操作される。圧力ホモジナイゼーションは、発酵化学の分野において、高压で細胞を破壊するために[ケシャベルツら(Keshavarz, E. et al.), 1987, "Separations for Biotechnology", Ed. Verrall & Hudson, Chap.3, 62-79)]、また乳製品工業の分野では、乳製品の脂肪粒のサイズを減少するために[フィップス(Phipps, L.W.), 1976, N.I.R.D., Paper 4426, 61-82]用いられていたが、ポリマー、特に多糖類の分子量の制御された減少を目的とする使用については、考えられたことも示唆されたこともない。別々の製造元、例えばAPV、Rennie、Constant Systems およびBran & Luebbeなど、から多くの既知の圧力ホモジナイザーが供給されており、それらは細部は異なるが同様の原理で作動し、本発明の目的においては、同様に機能する。

【0006】上記の市販の装置で約275MPaまでの作動圧力を得ることは可能であるが、最大圧力約105MPaがより普通と考えられる。例えばHA溶液などの特定の材料は1またはそれ以上の回数、おそらく20回またはそれ以上の回数パッセージさせることができるであろう。理解されるように、ある圧力で1回パッセージさせるよりも、一定の圧力の下で数回パッセージさせる方法によって、特定の分子量減少を行う方がより実用的であり、利用可能な選択の結果は総じて同等であり得る。達成されるべき結果と適用すべき圧力および圧力またはパッセージの適用の数の相互関係は当業者に良く理解されており、必要に応じて研究され、過剰な日常的な実験なしに行うことができる。供給材料の選択形がプロセス条件に僅かに影響するかもしれないが、それは一般に、特に重大な影響ではない。特定の場合に所望の結果を得るに好都合な条件の組み合わせに至ることは通常の平均的な技術者の能力範囲である。例えば、HA溶液の例を挙げると、分子量を約 $2 \times 10^6$ Dから約 $1 \times 10^6$ Dに減少することには、30MPaまで、好ましくは15-27MPaの圧力で1回パッセージすることが含まれ、また分子量約 $1 \times 10^6$ D以下への減少には、例えば、約100MPaで20回パッセージすることが含まれる。

【0007】本発明の幾つかの好ましい実施態様を以下に示す。分子量 $1.2 - 1.5 \times 10^6$ Dを得るためには、HA/CTAB溶液を10-25MPaの圧力で1

回パッセージの圧力ホモジナイゼーションに付す。分子量 $1.2 - 1.5 \times 10^6$ Dを得るためには、精製HA溶液またはHA細胞不含プロスを5-20MPaの圧力で1回パッセージの圧力ホモジナイゼーションに付す。分子量約100,000D以下のHAを得るためには、供給材料を、高压、好ましくは少なくとも100MPaの圧力で、複数回、好ましくは少なくとも20回パッセージの圧力ホモジナイゼーションに付す。さらに、厳格な多分散性、通常2以下、は正常な分布を表し、本発明の分子量減少が良く規定され、制御され、一義的にホモジナイザーを通しての圧力に依存することを示している。有利な分子量減少は単に、広範囲におよぶ多様な分子量フラグメントが生成することの結果ではない。

【0008】処理容量は固定されており、機械の大きさによってのみ限定され、処理すべき容量に適したように量られるので、ホモジナイザーを通してのプロセッシングは時間に依存しない。機械を通るパッセージは、適用される圧力に応じて、例えば、多糖類溶液の温度を高めるが、これは、材料溶液が室温以下であることを条件として、普通は重大でない。HAをパッセージさせる圧力を計算するための初期重量平均分子量が与えられれば、一般化された参考データにより、特定の分子量を達成することは可能である。HAの重量平均分子量の所望の減少は、見掛け上の粘度測定値によって証明し、追跡することが可能である。見掛け上の粘度測定値は、例えば、多角度レーザー光線スキャタリング(multiangle laser light scattering: MALLS)または内因性粘度測定(intrinsic viscosity measurements: Ubbelohde viscometry)による分析に従い、HA分子量に関連づけることができる。低分子量種の分析のためには、例えば、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)およびポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)法の方が適当である。

【0009】HAは細胞不含発酵プロス、食塩水/水に溶解した精製HAとして、あるいは食塩水に溶解したHA/セチルトリメチルアンモニウムブロミド(CTAB)(処理中間体)として存在し得る。現時点で好ましい実施態様には、Streptococcus zooepidemicusを培養し、細菌細胞からHAを分離することが含まれる。この工程で生産された細胞不含プロスを、次いで、ポリカチオン性界面活性剤、例えば、CTABを用いて沈殿させる。次いで、HA/CTABを食塩水に再懸濁し、圧力ホモジナイザーにパッセージさせ、所望の分子量減少を達成する。本発明の方法は細胞不含発酵プロスまたは再溶解HAの両方に等しく適用可能である。

【0010】本発明は、見掛けの粘度と溶液中のHAの分子量との関係を知ることにより、あらかじめ作成したデータから測定される圧力でホモジナイザーに1回またはそれ以上パッセージさせることにより、HAの分子量を所望の特定の範囲に減少することを可能にする方法を

提供するものである。特に、そのような多糖類の重量平均分子量を制御するために圧力ホモジナイゼーションを用いることの主たる利点は、特に、技術が予測可能であり、再現性があり、制御可能であり、後で中和や除去が必要な化学物質や酵素による処理が避けられることである。例示の方法は精製多糖類溶液、並びに、細胞不含発酵ブロス中の同じポリマーに適し、分子量または濃度に無関係に様々なポリマーに適用可能である。圧力ホモジナイザーへの流入またはまたはそれからの流出の見掛けの粘度の測定により、あらかじめ用意しておいた、任意のポリマー濃度での分子量と見掛けの粘度を予測するためのデータから、達成された分子量減少を外挿することができる。観察された、制御された分子量減少の、機械のサイズの相違、流速の相違、機械製造者の相違による差異は、圧力ホモジナイザーの操作方法によって起こり得ないことになるであろう。このことは別々の供給者からの異なる大きさの機械（例えば、APV Manton-Gaulin MC4, Rannie Mini-Lab 8.30E およびAlfa-Laval Bran & Luebba SHL120）を用いて確認された。本発明方法によって、例えば、特別の適用のための、特定の重量平均分子量の多糖類ポリマーを迅速に製造することができる。

#### 【0011】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。

#### 実施例1

上記のごとく、高分子量の殻HAの大量生産に最適な生理学的条件下での *Streptococcus zooepidemicus* の嫌気発酵物がHAの好都合な供給源である。14-24時間発酵させた後、細胞を収穫した。次いで、殻HAを除去し、弱いポリカチオン性界面活性剤により、細胞を完全に脱殻し生菌数を0に減少するに十分な時間、例えば、2時間、処理して殺した。次いで、ろ過または遠心によってHA溶液から細胞を分離した。得られたHA含有細胞不含ブロスを、次いで、約41.4 MPa (6000 psig) までの段階的な範囲の圧力下、室温で圧力ホモジナイザー (APV Manton-Gaulin MC4) にパッセージさせた。各設定圧力で試料をとり、MALLSによって分子量を分析し、該工程について見掛けの粘度を測定した。パッセージ後のHAの分子量をパッセージ中のホモジナイゼーション圧力に対してプロットした (添付の図1参照)。HAの重量平均分子量における減少はHA含有ブロスのパッセージ中の圧力に依存していた。

#### 【0012】実施例2

精製HA粉末 (分子量  $> 2 \times 10^6$  D) を脱ミネラル水 (0.1%および0.4% (w/v)) に溶解し、約100 MPa (14,500 psig) までの段階的な範囲の圧力下、室温で圧力ホモジナイザー (Rannie 8.30 E) にパッセージさせた。試料をとり、見掛けの粘度を測定し、MALLS分析を行った (添付の図2および図3参照)。分子量の減少は、細胞不含発酵ブロスを用いたと

きに観察された分子量減少を反映しており、制御された分子量のHAの製造はHAを含有する細胞不含発酵ブロスと同様、精製HAを用いても行うことができることが確認された。

#### 【0013】実施例3

HA/CTAB (4% (w/v)) を食塩水 (NaCl, 1 M) に溶解し、約41.4 MPa (6000 psig) までの段階的な範囲の圧力下、室温で圧力ホモジナイザー (Alfa-Laval Bran & Luebbe SHL 120) にパッセージさせた。試料をとり、見掛けの粘度を測定し、MALLS分析を行った。結果は、また、分子量の制御された減少はHA含有溶液のパッセージにおけるホモジナイゼーション圧に依存することを示していた (添付の図4参照)。

#### 【0014】実施例4

CMC (Sigma, カタログアイテム C5013) を脱ミネラル水 (0.5% (w/v)) に溶解し、約41.4 MPa (6000 psig) までの段階的な範囲の圧力下、室温で圧力ホモジナイザー (Rannie 8.30 E) にパッセージさせた。試料をとり、見掛けの粘度を測定し、MALLS分析を行った。分子量減少は制御し得、予測可能であり、再現性がある (添付の図5参照)。観察された、制御された分解の性質はHA溶液のそれに類似しており、本発明方法が、特に、HA以外の多糖類にも使用できることが確認された。

#### 【0015】実施例5

GG (Aqualon, 米国) を脱ミネラル水 (0.4% (w/v)) に溶解し、約41.4 MPa (6000 psig) までの段階的な範囲の圧力下、室温で圧力ホモジナイザー (Rannie 8.30 E) にパッセージさせた。試料をとり、見掛けの粘度を測定し、MALLS分析を行った。この場合も分子量減少は制御し得、予測可能であり (添付の図6参照)、例示の他の多糖類に関して観察された減少と同様の傾向があり、本発明方法が、多糖類および他のポリマー類に同様に、普遍的に適用可能であることが確認された。

#### 【0016】実施例6

精製HA粉末 (分子量  $> 2 \times 10^6$  D) を脱ミネラル水 (0.1% (w/v)) に溶解し、約100 MPa (14,500 psig) の一定圧力下、圧力ホモジナイザー (Rannie 8.30 E) に10または20回パッセージさせた。試料をとり、見掛けの粘度を測定し、HPLCまたはPAGE分析を行った (下記の表1参照)。分子量減少から、単一パッセージによる分子量過減少が禁止されている圧力に相当するレベルの圧力において、圧力ホモジナイザーに複数回パッセージさせることにより、非常に低分子量フラグメントが得られることが確認された。

#### 【0017】

#### 【表1】

7 適用圧力	8 パッセージ回数	平均分子量 (KD)	平均粘度 (MPa)
0	0	2200	40.4
100	10	180	3.14
100	20	84	2.81

【0018】

【発明の効果】本発明の圧力ホモジナイゼーションを用いる方法は、分子量減少予測可能であり、再現性があり、制御可能であり、後で中和や除去が必要な化学物質や酵素による処理が避けられる。また本発明方法によれば、従来困難であったポリマー、特に多糖類、とりわけ

【図面の簡単な説明】

【図1】HA細胞不含ブロスを圧力ホモジナイザーにかけて分子量を減少した場合の、圧力ホモジナイザーパッセージ後のHAの分子量とパッセージ中のホモジナイゼーション圧力との関係を示すグラフ。

【図2】脱ミネラル水中精製HA粉末(0.1%)を圧力ホモジナイザーにかけて分子量を減少した場合の、圧力ホモジナイザーパッセージ後のHAの分子量とパッセージ中のホモジナイゼーション圧力との関係を示すグラフ。

【図3】脱ミネラル水中の精製HA溶液(0.4%)を

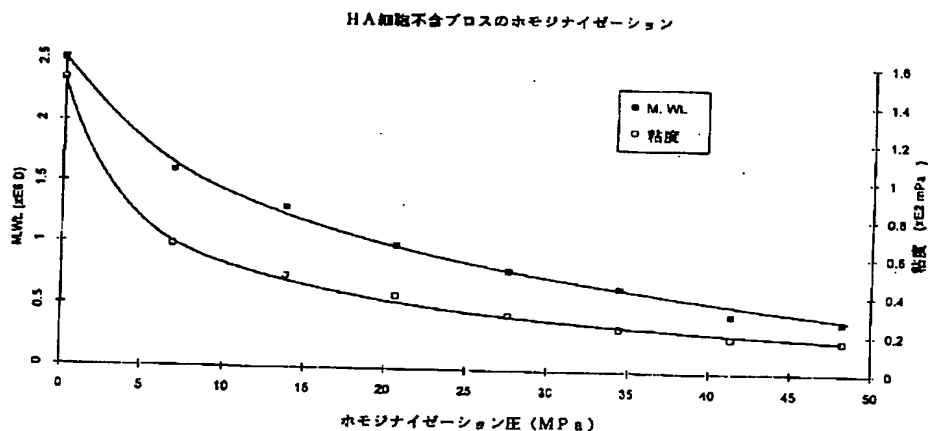
圧力ホモジナイザーにかけて分子量を減少した場合の、圧力ホモジナイザーパッセージ後のHAの分子量とパッセージ中のホモジナイゼーション圧力との関係を示すグラフ。

【図4】食塩水中のHA/CTAB溶液(4%)を圧力ホモジナイザーにかけて分子量を減少した場合の、圧力ホモジナイザーパッセージ後のHAの分子量とパッセージ中のホモジナイゼーション圧力との関係を示すグラフ。

【図5】脱ミネラル水中のCMC溶液(0.5%)を圧力ホモジナイザーにかけて分子量を減少した場合の、圧力ホモジナイザーパッセージ後のHAの分子量とパッセージ中のホモジナイゼーション圧力との関係を示すグラフ。

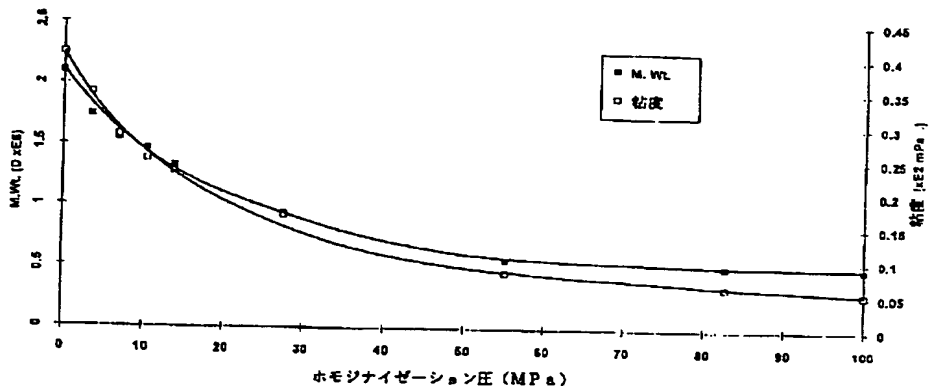
【図6】脱ミネラル水中のグアーゴム溶液(0.4%)を圧力ホモジナイザーにかけて分子量を減少した場合の、圧力ホモジナイザーパッセージ後のHAの分子量とパッセージ中のホモジナイゼーション圧力との関係を示すグラフ。

【図1】



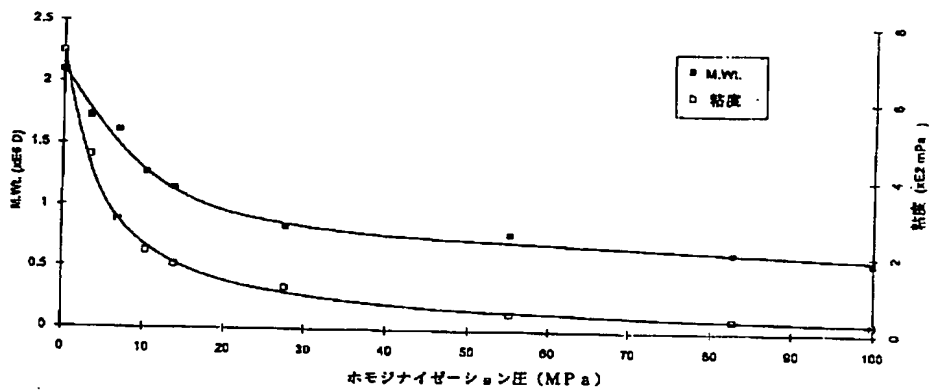
【図2】

0.1%HAのホモジナイゼーション



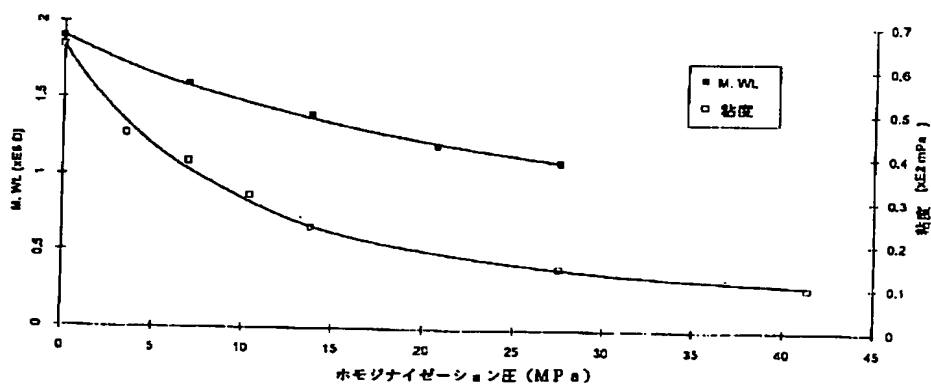
【図3】

0.4%HAのホモジナイゼーション

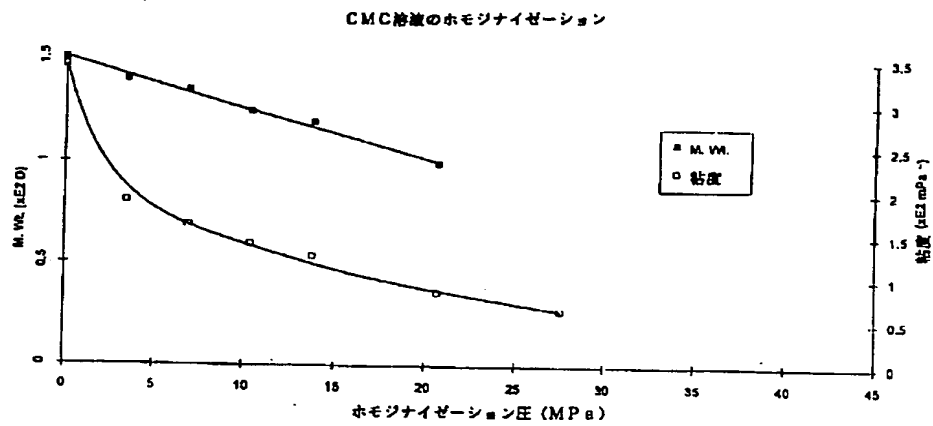


【図4】

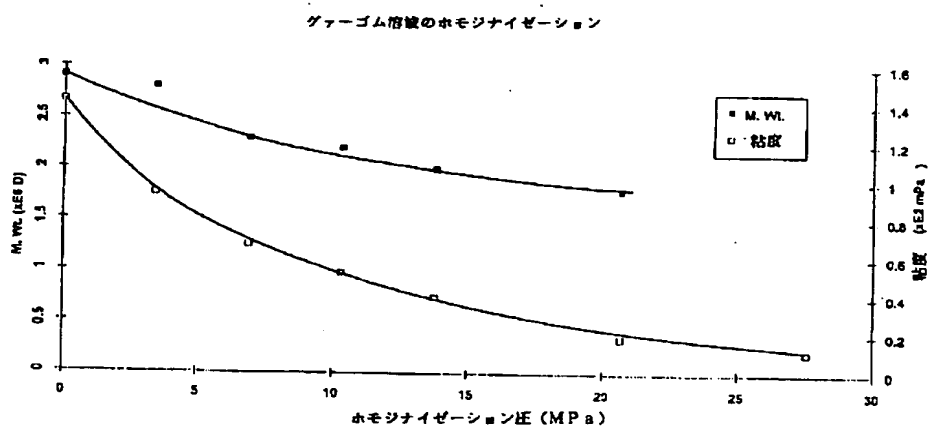
HA/CTAB溶液のホモジナイゼーション



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 ジョン・アンドリュー・ラブレディ  
イギリス、イングランド、ケント、メイド  
ストーン、ピアステッド、ローズアクレ  
23番